

## 溶出波ポーラログラフ法によるシステイン, シスチンの電気化学的挙動に関する研究

坂根, 康秀  
九州大学農学部食品分析学教室

松本, 清  
九州大学農学部食品分析学教室

箴島, 豊  
九州大学農学部食品分析学教室

<https://doi.org/10.15017/22268>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 35 (1/2), pp.37-44, 1981-03. 九州大学農学部  
バージョン :  
権利関係 :

# 溶出波ポーラログラフ法によるシステイン, シスチン の電気化学的挙動に関する研究

坂根 康秀・松本 清・箴島 豊

九州大学農学部食品分析学教室

(1980年12月10日受理)

## Studies on Electrochemical Behaviors of Cysteine and Cystine with Cathodic Stripping Voltammetry

YASUhide SAKANE, KIYOSHI MATSUMOTO  
and Yutaka OSAJIMA

Laboratory of Food Analysis, Faculty of Agriculture,  
Kyushu University 46-09, Fukuoka 812

### 緒 言

分子内にSH基を有するシステイン(以下RSHと略す)と、その酸化型であるシスチン(以下RSSRと略す)は自然界に広く分布するアミノ酸である。RSH, RSSRはタンパク質の構成成分として重要であるばかりでなく、生体内酸化還元過程で重要な役割をはたすと考えられている。

RSH, RSSRの電極反応はコバルトによる触媒波がBrdickaにより発見されて以来、多くの研究者により研究されてきた(Kolthoff and Barnum, 1940; Kolthoff *et al.*, 1955; Biegler and Breyer, 1959)。しかし、その電極反応は極めて複雑であり、未だ十分に解明されていない。著者らは、この電極反応の性質を明らかにするとともに、食品中のRSH, RSSRの直接定量を目的として、陰極溶出法による溶出波ポーラログラフ法を用いて検討したので報告する。

### 実 験 方 法

#### 1. 装置

ポーラログラフ: 関数発生器(NF回路設計ブロック社, FG-121B)より得られる三角波をP8CV(柳本製作所)にインプットし、得られたシグナルをデジタルメモリー(岩崎通信社, DM 305)に入れ、記録計(柳本製作所, YR 101)にて記録した。

セルおよび電極: セルは参照電極として飽和カロメル電極を接続したH型セルを使用した。H型セルの中間のシントードガラスはG-3を用い、飽和塩化カリウムの3%寒天橋により接続した。対極には直径1mm, 長さ10cmの白金線を線状に巻いたものを、また作用電極にはMetrohm社, E-410 HMDE(表面積0.0138cm<sup>2</sup>)を用いた。

#### 2. 試薬

水は脱イオン水を3回蒸留して使用した。システインは半井化学製の一塩酸一水化物を用い、調製後ただちに除酸素した。シスチンは半井化学製の二塩酸塩を極少量の塩酸で溶かし調製した。なお、システイン、シスチンの溶液は毎日調製した。他の試薬は市販特級品を用いた。

#### 3. 測定条件

被検液を約20分間チッ素ガスで除酸素した後、作用電極を挿入し、電圧をかけた。サイクリックボルタンメトリーの場合は、電圧をかけた30秒後に電位掃引を開始した。溶出波ポーラログラフ法の場合は電圧をかけたと同時に溶液をスターラー(300rpm)で一定時間攪拌した後、溶液を30秒間静止させ、電位掃引を開始した。

## 実験結果

### 1. RSH, RSSR の電極反応

#### 1.1 サイクリックボルタンメトリー

0.1 M-KNO<sub>3</sub> を含む pH 6.0 の McIlvaine 緩衝液中で 10<sup>-4</sup>M の RSH, RSSR をサイクリックボルタンメトリーにより測定し, Figs. 1, 2 の結果を得た. RSH の場合, 電位掃引速度 (V) 3 V/s で初期加電圧 ( $E_i$ ) を 0V とし掃引を行うと -0.425 V と -0.475 V (以下それぞれの波を RSH の第 1 波, 第 2 波と称す) に還元波を, また -0.385 V に酸化波を与えた. RSH の濃度を減少させると第 1 波は消失し, 第 2 波のみとなった (後述). また掃引を -1.5 V から行うと, -0.385 V に酸化波, -0.45 V に還元波を与えた. このときの還元波は 0V から掃引を行った場合に比べると著しく小さかった.

一方, RSSR の場合には掃引を 0V から行うと -0.455 V と -0.97 V (以下それぞれの波を RSSR の第 1 波, 第 2 波と称す) に還元波を, また -0.38 V

に酸化波を与えた. 掃引を -1.5 V から行うと -0.46 V に還元波を与え, -0.97 V 付近にはピークは認められなかった. このときの -0.46 V の還元波は 0V から掃引を行った場合の -0.455 V の還元波より, 多少波高を増大した.

#### 1.2 掃引速度依存性

それぞれの還元波について掃引速度によるピーク電流 ( $I_p$ ) の変化を調べ Figs. 3, 4 の結果を得た. 測定は  $E_i$  を 0V とし, 前電解時間 ( $\tau$ ) を 2 分とした溶出波ポーログラフ法で行った. 10<sup>-5</sup>M の RSH 溶液では第 1 波はほとんど現われなかった. Fig. 3 に示したように RSH の第 2 波と RSSR の第 1 波は掃引速度に直接比例してピーク電流を増大した. この挙動は吸着波の特徴である. 一方, RSSR の第 2 波は掃引速度の平方根に比例してピーク電流を増大し, 拡散波に特有の挙動を示した. また, これらの波はいずれも掃引速度の増大に伴ってピーク電位 ( $E_p$ ) を陰電位側に移行した.

#### 1.3 pH 依存性

RSH の第 2 波, および RSSR の第 1 波について

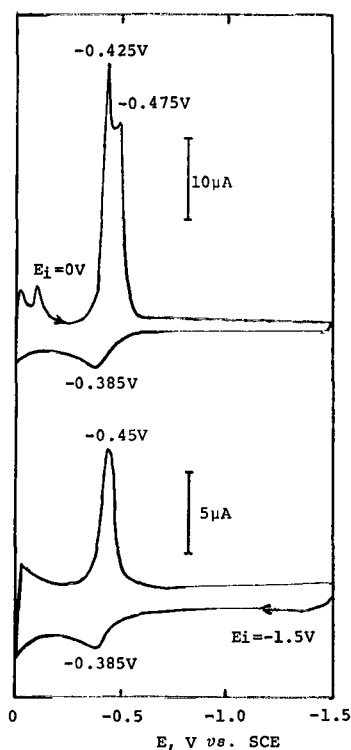


Fig. 1. Cyclic voltammograms of cysteine (RSH). [RSH]=10<sup>-4</sup>M,  $V=3$  V/s, pH 6.0 McIlvaine buffer.

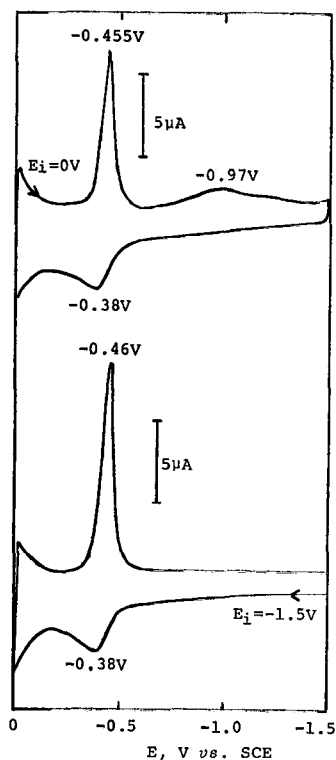


Fig. 2. Cyclic voltammograms of cysteine (RSSR). [RSSR]=10<sup>-4</sup>M,  $V=3$  V/s, pH 6.0 McIlvaine buffer.

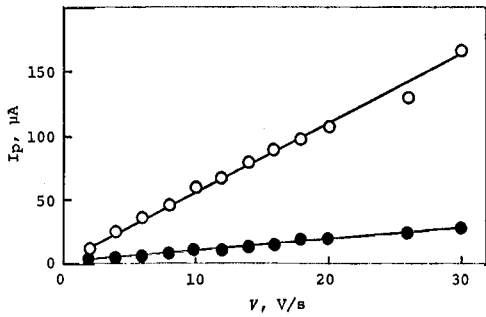


Fig. 3. Effect of scan rate ( $V$ ) on  $I_p$ .  $\circ$ ;  $10^{-5}M$  RSH, second wave,  $\bullet$ ;  $10^{-5}M$  RSSR, first wave,  $E_t=0V$ ,  $\tau=2$  min., pH 6.0 McIlvaine buffer.

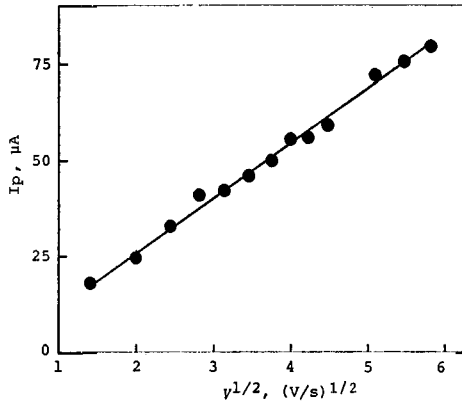


Fig. 4. Effect of scan rate ( $V$ ) on  $I_p$  of RSSR second wave.  $[RSSR]=10^{-4}M$ ,  $E_t=0V$ ,  $\tau=2$  min., pH 6.0 McIlvaine buffer.

pH によるピーク電流とピーク電位の変化を McIlvaine 緩衝液中で調べ、Figs. 5, 6 の結果を得た。pH による RSH の第 2 波のピーク電流はほとんど変化をうけなかつたが、RSSR の第 1 波はアルカリ性になると著しくピーク電流を増大し、pH 8 では RSH の第 2 波とほぼ同じ値を示した。このときのピーク電位の変化は RSH の第 2 波の場合、pH 3~8 で pH 値と直線関係にあり、58 mV/pH 単位で pH 増大に伴う陰電位移行を呈した。また RSSR の第 1 波の場合にも同様な陰電位移行を呈したが、その程度は pH 3~6 で 58 mV/pH 単位、pH 6~8 で 72 mV/pH 単位であった。

電極反応が可逆で、その電極反応に関与するプロトン数と電子数が等しい場合、ピーク電位の pH による変化は Nernst 式から 25°C で 59 mV/pH 単位となる。RSH の第 2 波の場合には理論値に一致した。RSSR の第 1 波が pH 6~8 で 72 mV/pH 単位とな

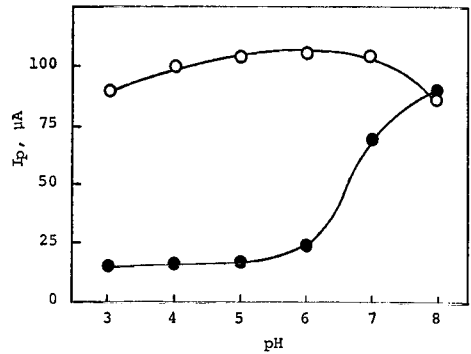


Fig. 5. Effect of pH on  $I_p$ .  $\circ$ ;  $10^{-5}M$  RSH, second wave,  $\bullet$ ;  $10^{-5}M$  RSSR, first wave,  $E_t=0V$ ,  $\tau=2$  min.,  $V=20$  V/s, McIlvaine buffer.

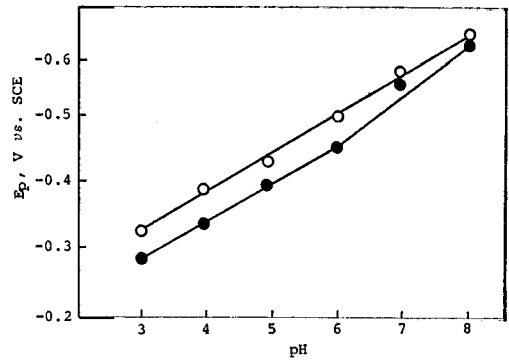


Fig. 6. Effect of pH on peak potential ( $E_p$ ).  $\circ$ ;  $10^{-5}M$  RSH, second wave,  $\bullet$ ;  $10^{-5}M$  RSSR, first wave,  $E_t=0V$ ,  $\tau=2$  min.,  $V=20$  V/s, McIlvaine buffer.

つたのは、電極反応が非可逆であるのではなく、アルカリ性では RSSR が分解し、RSH と同じ反応機構になるためであると Figs. 5, 6 の結果から推定した。

#### 1.4 濃度依存性と前電解時間依存性

RSH の第 2 波、および RSSR の第 1 波の濃度依存性を調べ、Figs. 7, 8 の結果を得た。RSH の第 2 波のピーク電流と RSH の濃度の関係は  $8 \times 10^{-7} \sim 3 \times 10^{-6}M$  と  $3 \times 10^{-6} \sim 6 \times 10^{-6}M$  の範囲でそれぞれ傾きの異なつた 2 本の直線を与えた。一方、RSSR の第 1 波は  $2 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-5}M$  の範囲でピーク電流は RSSR 濃度と直線関係を示した。このことより RSSR は溶出波ポーログラフ法による直接定量が可能である。

RSH と RSSR 第 1 波の前電解時間 ( $\tau$ ) によるピーク電流の変化を調べ、Figs. 9, 10 の結果を得た。Fig. 11 は RSH の場合のボルタモグラムである。図から明らかなように  $10^{-4}M$  では第 1 波が現われたが、

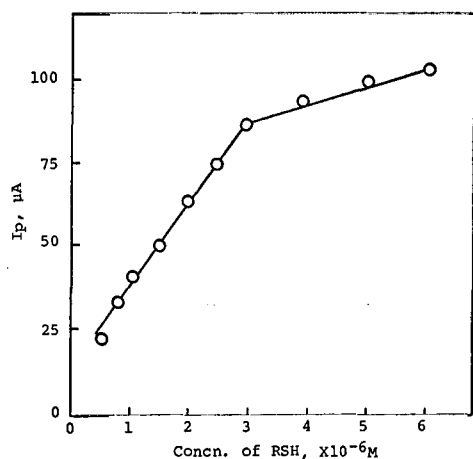


Fig. 7. Effect of RSH concentration on  $I_p$  of RSH second wave.  $E_t=0$  V,  $\tau=2$  min.,  $V=20$  V/s, pH 6.0 McIlvaine buffer.

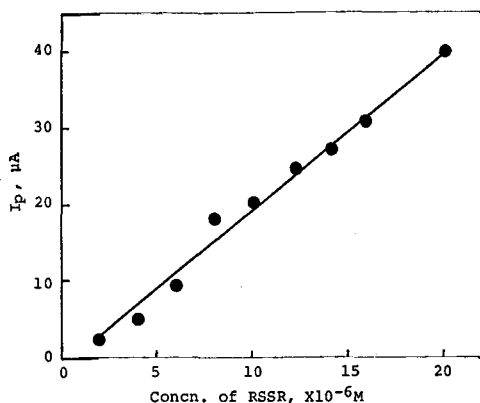


Fig. 8. Effect of RSSR concentration on  $I_p$  of RSSR first wave.  $E_t=0$  V,  $\tau=2$  min.,  $V=20$  V/s, pH 6.0 McIlvaine buffer.

$10^{-5}$  M では  $\tau=0$  のとき第1波はまったく現われず、 $\tau=30$  s で第1波と考えられる肩が現われた。しかし、さらに  $\tau$  を長くしてもボルタモグラムは  $\tau=30$  s のときと本質的には同じであり、肩の増大は認められなかった。RSH の波は前電解時間が長くなるとピーク電流が減少する傾向 (Fig. 9) を示し、電極表面で何らかの変化が生じているのではないかと考えられた。Fig. 7 と Fig. 9 の結果から RSH の第2波に相当する吸着種は単分子層を形成した後、一種の格子形成層を作るのではないかと推定した。

一方、RSSR の場合 (Fig. 10)、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  M 溶液ではそのピーク電流は前電解時間が長くなると飽和特性を示した。しかし  $10^{-4}$  M では RSH の場合と同様、前電解時間が長くなるとピーク電流の減少をきた

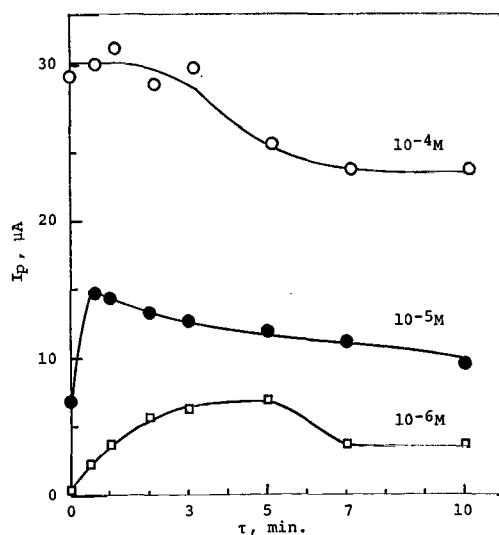


Fig. 9. Effect of pre-electrolysis time ( $\tau$ ) on  $I_p$  of RSH wave.  $E_t=0$  V,  $V=2$  V/s, pH 5.0 Acetate buffer.

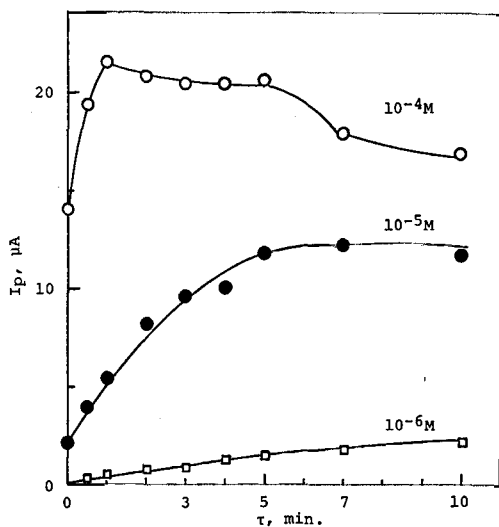


Fig. 10. Effect of pre-electrolysis time ( $\tau$ ) on  $I_p$  of RSSR first wave.  $E_t=0$  V,  $V=2$  V/s, pH 5.0 Acetate buffer.

した。なお  $10^{-4}$  M の RSSR 溶液では RSH の第1波のような波は現われなかった。

### 1.5 反応機構の推定

#### (a) RSH

RSH は還元型であり、分子内にはさらに還元される部位はないので、ボルタモグラムに現われた還元波は RSH の酸化生成物が再び還元されるとき波と考えられる。SH 化合物は水銀電極上で酸化され、不溶

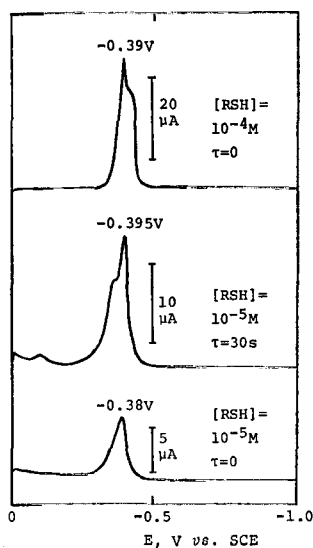
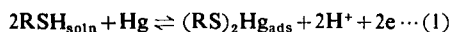


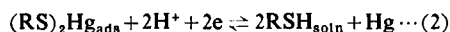
Fig. 11. Cathodic stripping voltammograms of RSH.  $E_i = 0\text{ V}$ ,  $V = 2\text{ V/s}$ , pH 5.0 Acetate buffer.

性的水銀塩を生成することがよく知られている。RSHの場合、この水銀塩が前電解過程で生成され、電極に吸着すると考えられる。RSHの第2波のピーク電位のpH依存性が58 mV/pH単位であつたことはNernst式に従う、つまり可逆であることを示している。よつて第2波の電極反応を次のように推定した：

前電解過程



溶出過程



第1波について Miller and Teva (1972) は吸着したRSHgの還元によるものと推定した。しかしRSHgの還元と考えるにはあまりにもピークが鋭すぎる。このような鋭いピークは形成された吸着膜がコンパクトな形である場合の還元にはしばしば見られる(Laviron, 1974)。一般にコンパクトな膜の還元はおこりにくいのが通常である。従つて正常な吸着波より陰電位側に現われるはずである。Stankovich and Bard (1977) は、この第1波はコンパクトな膜を形成するときの容量変化であり、非ファラデー電流であろうと推定している。

(b) RSSR

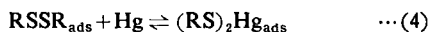
第1波は吸着的にふるまうことが掃引速度とピーク電流の関係から明らかである。Stankovich and Bard (1977) はRSSRがそのままの形で吸着し、

RSSRから $(\text{RS})_2\text{Hg}$ に変化する量はごくわずかであると報告している。従つて第1波の吸着種はRSSRと $(\text{RS})_2\text{Hg}$ の両者であると考えられる。よつてRSSRの濃度が低い場合には前電解時間に対して飽和特性を示すが、濃度が高くなるとRSSRから $(\text{RS})_2\text{Hg}$ が形成される量が増すのでRSHの第2波と同様な挙動を示すものと考えられた(Fig. 10)。

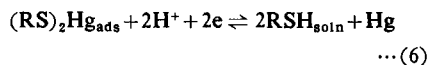
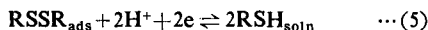
またpHが高くなると $\beta$ -脱離機構(大饗, 1970)によりRSSRが分解され、その分解生成物である $\text{RS}^-$ またはRSHが水銀電極と反応し、RSHの場合と同じ反応機構によつて還元されるものと推定した。よつて第1波の反応機構を次のように推定した：

pH 6 以下

前電解過程

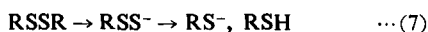


溶出過程

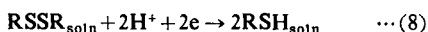


pH 6 以上

$\beta$ -脱離機構



第2波は拡散支配の波であり、その還元波に相当する酸化波が見られないことから、非可逆の波であると考えられた。この反応機構は溶液中のRSSRが拡散支配で還元される波である：



従つて、-1.5 Vから掃引を行つたサイクリックボルタンメトリー(Fig. 2)ではRSHがあらかじめ形成されるのでRSSRの第1波は増大し、電極近傍のRSSRが減少したため、第2波は現われなかつたものと推定した。

## 2. 銅(II)との反応

RSH, RSSR溶液に2価の銅を添加すると、RSHの第2波、RSSRの第1波より陰電位側にそれぞれ新たな波を与えた。RSH, RSSRの濃度を $4 \times 10^{-6}\text{ M}$ とし、銅(II)の濃度を $10^{-4}\text{ M}$ としてこれらの波のピーク電位のpH依存性をクエン酸緩衝液中で調べFig. 12の結果を得た。RSHに銅が関与した波はpH 5以下では30 mV/pH単位で、またpH 5以上では60 mV/pH単位でpHの増大に伴う陰電移行を呈し

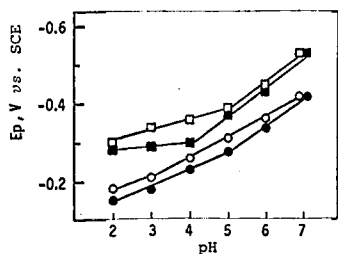


Fig. 12. Effect of pH on  $E_p$  of RSH or RSSR with Cu (II). ○; RSH second wave, ●; RSSR first wave, □; Cu-RSH, ■; Cu-RSSR, [RSH] =  $4 \times 10^{-6}$  M, [RSSR] =  $4 \times 10^{-6}$  M, [Cu] =  $10^{-4}$  M,  $E_i = 0$  V,  $\tau = 2$  min.,  $V = 20$  V/s, Citrate buffer.

た。一方、RSSR に銅が関与した波は pH 4 までは  $10$  mV/pH 単位で陰電位移行を呈し、pH 増大に伴い RSH に銅が関与した波に近づいた。しかし RSH, RSSR の濃度を  $2 \times 10^{-5}$  M, 銅(II)の濃度を  $2 \times 10^{-7}$  M とした場合には異なつた挙動を示した。この場合、RSH に銅が関与した波のピーク電位の pH 依存性は pH 2~7 で  $62$  mV/pH 単位で陰電位移行を呈した。一方、RSSR に銅が関与した波のピーク電位は pH 2~4, pH 5~7 で pH に対し直線を与え、その傾きはそれぞれ  $60$  mV/pH,  $65$  mV/pH であつた。これらの結果から、RSH あるいは RSSR の濃度と銅の濃度の比により、形成される銅との化合物は異なると推定された。

クエン酸の終濃度を  $0.04$  M とした pH 6.0 のクエン酸緩衝液中で RSH と RSSR の濃度を  $10^{-5}$  M とし、各々の系に 2 価の銅を添加した。そのときのピーク電流の変化を Fig. 13 に示した。RSH の第 2 波は銅の濃度が増すにつれて減少したが、RSH に銅が関与した波は増大し、飽和特性を示した。一方、RSSR の第 1 波は銅の濃度を増すにつれて増大した後、RSH と同様減少した。このことから RSSR は銅の添加により分解が促進されるのではないかと考えられた。また銅が関与した波は RSH, RSSR のどちらの場合も掃引速度に比例してピーク電流を増大し、吸着的に挙動した。

この銅が関与した波を利用して RSH, RSSR の間接定量を試みた。pH 6.0 のクエン酸緩衝液中で銅(II)の濃度を  $10^{-4}$  M とし、RSH または RSSR を添加した。このときの RSH に銅が関与した波、および RSSR に銅が関与した波のピーク電流と RSH, RSSR の濃度をプロットしたのが Fig. 14 である。RSH の場合  $4 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-6}$  M の範囲で、ピーク

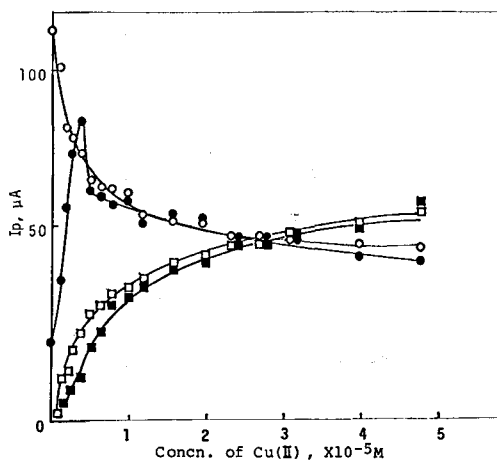


Fig. 13. Effect of Cu (II) on  $I_p$  of RSH or RSSR. ○; RSH, ●; RSSR, □; Cu-RSH, ■; Cu-RSSR, [RSH] =  $10^{-5}$  M, [RSSR] =  $10^{-5}$  M,  $E_i = 0$  V,  $\tau = 2$  min.,  $V = 20$  V/s, pH 6.0 Citrate buffer.

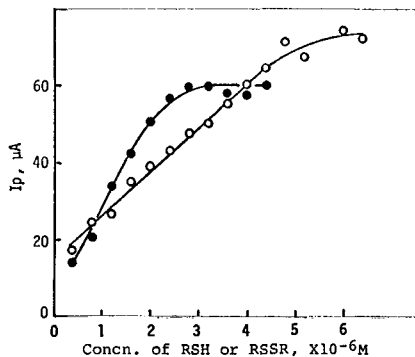


Fig. 14. Effect of RSH or RSSR concentration on Cu (II)-related wave. ○; Cu-RSH, ●; Cu-RSSR, [Cu] =  $10^{-4}$  M,  $E_i = 0$  V,  $\tau = 2$  min.,  $V = 20$  V/s, pH 6.0 Citrate buffer.

電流は濃度と直線関係を示した。しかし RSSR の場合は直線域がせまく、間接定量を行うのは困難であり、一層の検討を必要とする。

## 考 察

RSH, RSSR の電極反応は非常に複雑である。それらの波のピーク電位は掃引速度、および濃度に依存しているため、一層複雑な様相を呈した。また Fig. 1 で  $-1.5$  V から掃引したボルタモグラムに現われた還元波は、 $0$  V から掃引した場合の第 2 波と同一のものであると考えられたが、電位は  $25$  mV ずれていた。従つて RSH の第 1 波が現われるときには第 2 波が陰電位側に移行すると推定した。また RSH の電

極反応で特に興味があるのは第1波の挙動である。 $10^{-5}M$  の RSH 溶液を前電解すると第1波は肩として現われる (Fig. 11) が、前電解を長く行つてもほとんど変化しなかつた。このことから単分子吸着層ができるまでは第1波はまったく現われず、単分子吸着層ができて RSH の溶液内濃度により第1波の大きさは規定されるものと推定した。従つて  $10^{-4}M$  の場合にも前電解時間を長くしても第1波はあまり変化しないと考えられた。RSSR の場合には、0V からの1回目の掃引では RSH の第1波に相当する波は現われなかつた。このことは電極表面で RSSR から  $(RS)_2Hg$  への変化があまりおこっていないことを示唆している。しかし掃引をくり返し行くと RSH の第1波に相当する波が現われた。これは RSSR の還元により RSH が形成 (式 (5), (6), (8)) されるためと考えられた。

Kolthoff ら (Kolthoff and Stricks, 1951; Stricks and Kolthoff, 1951) も RSH, RSSR と銅の反応機構について報告しているが、これはアルカリ性での反応を見たものである。著者らは Fig. 12 の結果から銅が関与した吸着種は pH および RSH, または RSSR の濃度と銅の濃度の比により異なるものと推定した。しかし、銅が関与した吸着種の構造、あるいは反応については今のところ十分な説明はできておらず、今後の課題であろう。

さて RSH, RSSR の溶出波ポーログラフ法による定量を検討したが、RSH ではピーク電流と濃度、あるいは前電解時間との関係から考えて、定量は困難である。RSH の定量を行うには銅による間接定量を行う方が良いと考えられる。一方、RSSR の場合には直接定量が良い。しかし、RSH と RSSR の混合液で分別定量を行うことは波の重なりを生じるため困難である。しかし可能な方法としては RSSR の第2波により RSSR を定量した後、RSSR を十分還元し、RSH として全 RSH 量を定量する方法が考えられる。

## 要 約

システイン (RSH), シスチン (RSSR) の電気化学的挙動、および溶出波ポーログラフ法による定量を検討した。RSH, RSSR の電極反応は非常に複雑であり、それぞれのボルタモグラムには2種類の還元波が得られた。その電極反応は式 (1)~(8) であると推定された。溶出波ポーログラフ法による濃縮作用が認められるのは RSH の第2波 ( $E_p = -0.475V$ ,

pH 6.0) と RSSR の第1波 ( $E_p = -0.455V$ , pH 6.0) であつた。これら2つの波は吸着的に挙動したが、RSH の第2波は単純な飽和特性を示さず、電極表面での吸着種の変化が示唆された。

RSSR は溶出波ポーログラフ法による直接定量が可能である。一方、RSH については直接定量より2価の銅との波を利用した間接定量が有効であることが判明した。

## 文 献

- Biegler, T. and B. Breyer 1959 A.C. polarography of cystine. *Rev. Polarogr. (Kyoto)*, 7: 31-40
- Kolthoff, I. M. and C. Barnum 1940 The anodic reaction and waves of cysteine at the dropping mercury electrode and at the platinum micro wire electrode. *J. Amer. Chem. Soc.*, 62: 3061-3065
- Kolthoff, I. M. and W. Stricks 1951 Polarographic investigations of reactions in aqueous solutions containing copper and cysteine (cystine) II. Reactions in ammoniacal medium in the presence and absence of sulfite. *J. Amer. Chem. Soc.*, 73: 1728-1733
- Kolthoff, I. M., W. Stricks and N. Tanaka 1955 The polarographic prewaves of cystine (RSSR) and dithioglycolic acid (TSST) and the oxidation potentials of the systems RSSR-RSH and TSST-TSH. *J. Amer. Chem. Soc.*, 77: 4739-4742
- Laviron, E. 1974 Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry. *J. Electroanal. Chem.*, 52: 355-393
- Miller, I. R. and J. Teva 1972 The mechanism of electroreduction of cystine at the mercury electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 36: 157-166
- 大饗 茂 1970 有機イオウ化合物の化学 (上). 化学同人, 京都
- Stankovich, M. T. and A. J. Bard 1977 The electrochemistry of proteins and related substances I. Cystine and cysteine at the mercury electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 75: 487-505
- Stricks, W. and I. M. Kolthoff 1951 Polarographic investigations of reactions in aqueous solutions containing copper and cysteine (cystine) I. Cuprous copper and cysteine in ammoniacal medium. The dissociation constant of cuprous cysteinate. *J. Amer. Chem. Soc.*, 73: 1723-1727



### Summary

The electrochemical behaviors and the quantitative analyses of cysteine (RSH) and cystine (RSSR) have been studied with cathodic stripping voltammetry (c.s.v.). The electrode reactions of RSH and RSSR were rather complicated and each voltammogram had two kinds of reduction waves (RSH: first wave;  $E_p = -0.425$  V, pH 6.0, second wave;  $E_p = -0.475$  V, pH 6.0. RSSR: first wave;  $E_p = -0.455$  V, pH 6.0, second wave;  $E_p = -0.97$  V, pH 6.0). Their electrode reaction schemes were discussed.

Concentration effects of c.s.v. were observed with RSH second wave and RSSR first wave. Although these two waves behave adsorptively, RSH second wave didn't have simple saturation characteristic, which indicated the transition of adsorbed species at electrode surface.

Furthermore, copper (II) was added to the solutions of RSH and RSSR, respectively, and the electrochemical behaviors of these copper-related waves were also investigated.

It is possible to determine RSSR directly with c.s.v. On the other hand, it might be effective to determine RSH indirectly with copper-related wave.